

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 30 865 A 1

51 Int. Cl.7:
G 01 N 21/64
G 01 N 33/52

21 Aktenzeichen: 199 30 865.9
22 Anmeldetag: 5. 7. 1999
43 Offenlegungstag: 1. 2. 2001

71 Anmelder:
Schreiber, Ulrich, Dr., 97082 Würzburg, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

56 Entgegenhaltungen:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 19930865	A1	20010201	DE 1999-19930865	19990705

FI AB App. and methods for the detn. of the phytoplankton content of natural water samples by chlorophyll fluorescence measurements which allow for distinguishing among different algae groups on the basis of chlorophyll fluorescence measurements using a measuring beam in combination with strong pulses of light with different intensities, frequencies, phases, and wavelengths are described in which the app. includes a first light source for producing a weak measuring light for exciting fluorescence in a selected portion of the sample vol.; a second light source for illuminating the remaining vol. of the sample with a light intense enough to induce phototaxis (e.g., by dinoflagellates); means for detecting and recording the time-dependent changes in light in the sample vol. and the portion of the sample undergoing measurement; and means for comparing the changes to known values. The time-dependent changes in fluorescence exhibit relative amplitudes and time const. which are characteristic of certain dinoflagellate types.

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Chlorophyllfluorometer zur Phytoplanktonbestimmung

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung des Phytoplanktongehalts natürlicher Wasserproben mit Hilfe von Chlorophyllfluoreszenzmessungen, mit der besonderen Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Dinoflagellaten und Diatomeen, nachdem deren Summensignal mit einer bereits etablierten Methode gewonnen wurde. Das neue Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Wasserprobe in einem zweigeteilten Probenraum untersucht wird, wobei der eine Teil mit einem phototaktisch unwirksamen Fluoreszenz-Meßlicht und der andere Teil mit einem phototaktisch wirksamen Licht belichtet wird, welches nur bei den Dinoflagellaten typische Bewegungen zwischen den beiden Teilvolumina auslöst (positive oder negative Phototaxis). Die dadurch bedingten zeitabhängigen Fluoreszenzänderungen lassen sich durch Exponentialfunktionen der Form $F = F_0 \cdot e^{-t/c} + F_0 - KF$ mit relativen Amplituden KF/F_0 und Zeitkonstanten c beschreiben, welche für bestimmte Dinoflagellatenarten charakteristisch sind. Bei Wasserproben mit unbekanntem Gehalt an Dinoflagellaten und Diatomeen kann auf diese Weise Information über Gehalt und Artenzusammensetzung der Dinoflagellaten gewonnen werden.

BEST AVAILABLE COPY

Die Erfindung betrifft eine Meßeinrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Derartige Meßeinrichtungen sind aus der Literatur bekannt (Kolbowski J and Schreiber U 1995. Computer-controlled phytoplankton analyzer based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Mathis P ed., Vol. V, pp. 825-828, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; Schreiber U 1998. Chlorophyll fluorescence: New instruments for special applications. In: *Photosynthesis: Mechanisms and effects*. Garab G ed., hol. V, pp. 4253-4258, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; Beutler M, Wiltshire KH, Meyer B, Moldaenke C and Dau H 1998. Rapid depth profiling of the distribution of "spectral groups" of microalgae in lakes, rivers and in the sea. In: *Photosynthesis: Mechanisms and effects*. Garab G ed., Vol. V, pp. 4301-4304, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).

Der derzeitige Stand der Technik wird durch das im Handel erhältliche PHYTO-PAM Chlorophyllfluorometer gekennzeichnet, welches bei Schreiber (1998) beschrieben ist. Dieses Gerät verwendet lichtemittierende Dioden (LED) zur periodisch-alternierenden Fluoreszenzanregung mit 10 µs Meßlichtpulsen bei vier verschiedenen Wellenlängen. Mit Hilfe eines Computer-gestützten Dekonvolutionsprogramms ermittelt diese Einrichtung den Beitrag von drei verschiedenen Algengruppen zum Gesamtfluoreszenzsignal aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzanregungseigenschaften. Nach geeigneter Kalibrierung kann mit diesem Gerät innerhalb weniger Sekunden quantitative Information über die Chlorophyllgehalte der in einer Wasserprobe befindlichen Grünalgen, Diatomeen + Dinoflagellaten und Blaualgen (Cyanobakterien) gewonnen werden. Da sich die Diatomeen in ihren Photosynthese-Antennenpigmenten nicht wesentlich von den Dinoflagellaten unterscheiden, kann mit dieser bekannten Einrichtung nicht zwischen diesen beiden wichtigen Phytoplanktongruppen unterschieden werden. In der Praxis bedeutet dies eine beträchtliche Einschränkung der bisher verfügbaren Methodik, da Diatomeen und Dinoflagellaten, welche einen Großteil des marinen Phytoplanktons umfassen, aus ökophysiologischer/ökotoxikologischer Sicht recht unterschiedliche Rollen spielen. So sind für die sogenannten "Roten Tiden" vorwiegend Dinoflagellaten verantwortlich. In Verbindung mit den Roten Tiden tritt ein Massensterben von Fischen und anderen Meeresorganismen auf, welches durch Toxine verursacht wird (vor allem Saxitoxin), die von den Dinoflagellaten ausgeschieden werden. Beim Menschen kann dieses Gift nach Verzehr von infizierten Austern und Muscheln zu Lähmungen und Tod durch Erstickung führen. Zur Vermeidung derartiger Schäden ist die routinemäßige Bestimmung des Dinoflagellatengehalts von Küstengewässern zur Früherkennung eines beschleunigten Wachstums weltweit von großer praktischer Bedeutung. Die bisher übliche Bestimmung durch mikroskopische Auszählung ist sehr zeitaufwendig und im Rahmen eines flächendeckenden Überwachungsprogramms aus Kostengründen kaum realisierbar.

Der vorliegenden Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu ersinnen, das es erlaubt, trotz mangelnder Unterschiede zwischen den Fluoreszenzanregungsspektren von Diatomeen und Dinoflagellaten, dennoch mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen auf schnelle und einfache Weise zwischen diesen beiden Phytoplanktongruppen zu unterscheiden. Eine weitere Aufgabe bestand darin, eine Meßeinrichtung zu schaffen, welche die Anwendung dieses neuen Verfahrens in Kombination mit der inzwischen etab-

lierten Algenerkennung auf der Grundlage unterschiedlicher Fluoreszenzanregungsspektren ermöglicht und somit im Prinzip auch in einem modifizierten PHYTO-PAM Chlorophyllfluorometer integriert werden kann.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Die Merkmale der Ansprüche 2-5 geben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung an.

Dadurch, daß gemäß Anspruch 1 nur ein Teilvolumen der zu untersuchenden Wasserprobe zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz herangezogen wird und dieses Teilvolumen einer anderen Belichtung als das Restvolumen unterworfen wird, können die bekannten Unterschiede im phototaktischen Verhalten von Dinoflagellaten und Diatomeen zu deren Erkennung und Quantifizierung genutzt werden. Die Dinoflagellaten sind im Gegensatz zu den Diatomeen mit Flagellen ausgestattet, welche ihnen eine hohe Beweglichkeit verleihen. So sind die phototaktischen Bewegungen der Dinoflagellaten erfahrungsgemäß besonders schnell und ausgeprägt. Dagegen sind die phototaktischen Bewegungen der Diatomeen relativ langsam und erfordern außerdem einen festen Untergrund (z. B. Sediment), so daß sie in freiem Wasser praktisch keine Rolle spielen. Weiterhin ist bekannt, daß die meisten Dinoflagellaten im Gegensatz zu den Diatomeen eine besonders hohe Lichtempfindlichkeit aufweisen (Richardson K, Beardal J and Raven JA 1983 *Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies*. New Phytol. 93: 157-191). Bei moderaten Lichtintensitäten werden die Dinoflagellaten, wie andere bewegliche Algen, vom Licht angezogen, welches sie zum Betreiben der lebensnotwendigen Photosynthese benötigen (positive Phototaxis), wobei ein spezieller Lichtrezeptor mitwirkt (Levandosky M and Kaneta PM 1987 In: *Behaviour in Dinoflagellates*. Taylor FJR ed. pp. 360-397, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK). Wird die Lichtintensität jedoch so weit erhöht, daß die Gefahr einer Lichtschädigung besteht, wandern die Dinoflagellaten vom Licht weg und können so eine Schädigung vermeiden (negative Phototaxis).

Die vorliegende Erfindung nutzt dieses typische phototaktische Verhalten der Dinoflagellaten zu deren Unterscheidung von den Diatomeen. Die erfindungsgemäße Meßeinrichtung weist zu diesem Zwecke einen besonderen Probenraum auf, welcher sich in zwei Bereiche (Teilvolumina) mit unterschiedlichen Lichtbedingungen gliedert, zwischen denen sich die Dinoflagellaten entsprechend ihrer phototaktischen Eigenschaften verteilen können. Nur eines dieser Teilvolumina wird mit Meßlicht bestrahlt und wird somit bei der Fluoreszenzmessung erfaßt (Meßlichtvolumen). Dagegen wird nur das Restvolumen mit einem phototaktisch wirksamen Zusatzlicht bestrahlt. Wenn dieses Licht eingeschaltet wird, bewegen sich bei positiver Phototaxis die Dinoflagellaten in Richtung des Lichtes. Während vor dem Einschalten des phototaktisch wirksamen Lichtes die Zellen in einer anscheinend ungeordneten Bewegung zwischen dem Meßlicht- und dem Restvolumen fluktuieren, werden nach Einschalten dieses Lichtes solche Zellen, die sich zufällig von dem Meßlicht- in das Restvolumen bewegen dort "gefangen", indem sie in Lichtrichtung gelockt werden. In dieser Weise kommt es zu einer Nettobewegung der Dinoflagellaten vom Meßvolumen in das Restvolumen.

Da die Chlorophyllfluoreszenzintensität der Chlorophyllkonzentration und damit der Zelldichte proportional ist, drückt sich eine durch Phototaxis bewirkte Wanderung von Dinoflagellaten zwischen Meßlicht- und Restvolumen in einer entsprechenden Fluoreszenzänderung aus. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung ist das Meßlicht so schwach, daß es praktisch keine phototaktische Wirkung ausübt. In diesem Falle liegt

vor Einschalten des phototaktisch wirksamen Lichts eine weitgehend homogene Verteilung der Dinoflagellaten vor, welcher eine definierte Fluoreszenzintensität entspricht. Durch selektive Belichtung des Restvolumens mit einem Licht, welches bei Dinoflagellaten eine positive Phototaxis auslöst (z. B. Blaulicht mit ca. $500 \mu \text{ Einstein/m}^2 \text{ s}$), wird mit dem Verschwinden der Dinoflagellaten aus dem Meßlichtvolumen eine entsprechende Erniedrigung der Chlorophyllfluoreszenz hervorgerufen. Die Kinetik dieses Fluoreszenzabfalls folgt in erster Näherung einer exponentiellen Abklingkurve, welche durch eine charakteristische Zeitkonstante und eine charakteristische Amplitude gekennzeichnet ist. Diese Parameter, die bei den einzelnen Dinoflagellatenarten relative Unterschiede aufweisen, können mit Hilfe einer Computer-gestützten Signalanalyse, wie sie z. B. bei dem Stand der Technik beschreibenden PHYTO-PAM Chlorophyllfluorometer routinemäßig erfolgt, problemlos quantifiziert werden. Sie stellen im übertragenen Sinne einen "Fingerabdruck" der Dinoflagellaten dar, welcher zu deren Erkennung und Quantifizierung in gemischten Phytoplanktonpopulationen dienen kann. In der Praxis erfolgt diese Computer-gestützte Signalanalyse im Anschluß an die Abtrennung des Summensignals von Dinoflagellaten + Diatomeen von denen der anderen Algengruppen auf der Grundlage der unterschiedlichen Fluoreszenzanregungs-Charakteristika. Deshalb wird die Quantifizierung der Dinoflagellaten und die Unterscheidung verschiedener Dinoflagellaten-Arten auch nicht durch die Phototaxis anderer Algengruppen (z. B. Euglenophyceen, Chlamydomonadaceen bei den Grünalgen) gestört.

Andererseits kann das gleiche Verfahren im Prinzip auch dazu dienen, innerhalb der Gruppe der Grünalgen verschiedene Arten aufgrund derer unterschiedlichen phototaktischen Verhalten zu unterscheiden und zu quantifizieren. Generell funktioniert das Computergestützte Meßsystem im Sinne eines "Experten-Systems", d. h. die Datenanalyse basiert auf gespeicherter Detailinformation über das phototaktische Verhalten der relevanten Algenarten. Diese Information (charakteristische Amplituden und Zeitkonstanten) muß zuvor an Reinkulturen dieser Algenarten unter definierten Bedingungen in derselben Meßeinrichtung gewonnen werden.

Besondere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind naheliegend, um spezifische Merkmale im phototaktischen Verhalten einzelner Algengruppen zu erfassen und für die Erkennung zu nutzen. So ist das Ausmaß der phototaktischen Bewegung bei jeder Algengruppe durch ein bestimmtes Aktionsspektrum charakterisiert (Halldal P 1985. Action spectra of phototaxis and related problems in Volvocales, Ulva gametes and Dinophyceae. Physiologia Plantarum 14: 133–139). Dementsprechend kann das phototaktische Signal bestimmter Algengruppen durch die Wahl von Lichtquellen mit bestimmten Emissionsmaxima optimiert werden. Dazu bieten sich gemäß Anspruch 2 lichtemittierende Dioden (LED) an, wobei zum Anlocken der Dinoflagellaten die verbreiteten Blaulicht-LEDs mit einem Emissionspeak bei 470 nm optimal sind. Andererseits ist es in der Praxis von Vorteil, das Meßlichtvolumen einem starken, photosynthetisch aktiven Licht aussetzen zu können, wobei normalerweise nicht erwünscht ist, daß dieses gleichzeitig eine phototaktische Wirkung hat. So benutzt das dem Stand der Technik entsprechende PHYTO-PAM Chlorophyllfluorometer sättigende Lichtpulse zur Bestimmung der effektiven photochemischen Quantenausbeute, welche Aussagen über den physiologischen Zustand der Algen erlaubt (Schreiber 1998). Zu diesem Zwecke kann bei einer bevorzugten Ausführung der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung das Meßlichtvolumen mit sättigenden Rotlichtpulsen be-

lichtet werden, da Wellenlängen oberhalb von 550 nm erfahrungsgemäß phototaktisch unwirksam sind.

Es ist naheliegend, in einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung neben der positiven auch die negative Phototaxis von Dinoflagellaten und anderen phototaktisch aktiven Phytoplanktongruppen zu nutzen. Bei Erhöhung der Lichtintensität im Restvolumen des Probenraums auf einen übersättigenden Wert, bewirkt die Fluchtbewegung in das Meßlichtvolumen eine Fluoreszenzerhöhung, welche analog zur Fluoreszenzerniedrigung bei positiver Phototaxis zur Erkennung und Quantifizierung herangezogen werden kann.

Die Verwendung von lichtemittierenden Dioden (LED) gemäß Anspruch 2 ist von Vorteil, weil diese in Ausführungen mit phototaktisch wirksamem Blau- und phototaktisch unwirksamem/photosynthetisch wirksamem Rotlicht verfügbar sind. LEDs sind auch aufgrund ihrer trägheitslosen Ansteuerbarkeit, hohen Leuchtdichte und geringen Größe vorteilhaft.

Indem gemäß Anspruch 3 für die zweite, phototaktisch wirksame Lichtquelle solche LED-Typen eingesetzt werden, deren Emissionsmaximum dem Maximum des phototaktischen Aktionsspektrums (Peakwellenlänge) der zu erfassenden Algenklasse entspricht, wird bei gegebener Stromstärke die Wirkung des Lichts optimiert. Weiterhin können Unterschiede in den Peakwellenlängen zur Algenklassenerkennung herangezogen werden.

Dadurch, daß entsprechend Anspruch 4 eine phototaktisch unwirksame Intensität des Meßlichts gewählt wird, ist vor der eigentlichen phototaktischen Belichtung des Restvolumens eine homogene Verteilung der beweglichen Zellen in Meßlicht- und Restvolumen gewährleistet. Diese Bedingung stellt eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung der Dinoflagellaten-Konzentration in der zu untersuchenden Wasserprobe dar.

Indem gemäß Anspruch 5 die als LED-Array ausgestaltete erste Lichtquelle nicht nur schwaches Meßlicht sondern auch starkes, photosynthetisch aktives Rotlicht aussendet, kann mit der gleichen Meßeinrichtung auch die photosynthetische Aktivität der in einer Wasserprobe enthaltenen Mikroalgen untersucht werden. Durch die Verwendung von Rotlicht wird gewährleistet, daß bei Messung der photosynthetischen Aktivität keine phototaktische Reaktion ausgelöst wird.

Nachfolgend wird anhand von Zeichnungen eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Chlorophyllfluorometers zur Phytoplanktonbestimmung (Phototaxis-Chlorophyllfluorometer) beschrieben. In den Zeichnungen zeigt

Abb. 1 ein Funktionsschema des Phototaxis-Chlorophyllfluorometers,

Abb. 2 ein Zeitdiagramm der mit einer erfindungsgemäßen Ausführungsform des Phototaxis-Chlorophyllfluorometers bei plötzlich einsetzender Belichtung mit phototaktisch aktivem Licht gemessenen Fluoreszenzänderungen.

Die in **Abb. 1** in Form eines Funktionsblockschemas dargestellte Ausführungsform des Phototaxis-Chlorophyllfluorometers besteht aus einem zylindrischen Probenraum mit transparenten Wänden 1, welcher in zwei Teilvolumina (Meßlichtvolumen 2 und Restvolumen 3) gegliedert ist, sowie einem ersten ringförmigen LED-Array 4 zur Belichtung des Meßlichtvolumens 2 mit verschiedenfarbigem schwachen Meßlicht zur Anregung der Chlorophyllfluoreszenz und Rotlicht zum Treiben der Photosynthese, und einem zweiten ringförmigen LED-Array 5 zur Belichtung des Restvolumens 3 mit phototaktisch wirksamem Blaulicht. Die im Meßlichtvolumen 2 angeregte Fluoreszenz (schlangenförmiger Pfeil) wird durch die Linse 6 gesammelt und über das optische Filter 7, welches gestreutes Meßlicht ab-

sorbiert (gerader Pfeil) und die Fluoreszenz transmittiert, auf den Photodetektor 8 gebündelt, wo das Fluoreszenzsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und auf eine dem Stand der Technik entsprechende, übliche Weise weiterverarbeitet wird.

Abb. 2 zeigt den typischen Zeitverlauf der Chlorophyllfluoreszenzintensität F bei plötzlicher Belichtung einer Wasserprobe, welche phototaktisch aktive Dinoflagellaten enthält, mit phototaktisch wirksamem Blaulicht in dem erfindungsgemäßen Phototaxis-Chlorophyllfluorometer. Vor Beginn der phototaktischen Belichtung erfaßt das schwache Meßlicht im Meßlichtvolumen eine konstante Fluoreszenzintensität F_0 , welche ein Maß für die Konzentration des über Meßlicht- und Restvolumen gleichmäßig verteilten Chlorophylls ist. Nach Beginn der plötzlichen Belichtung sinkt die Fluoreszenzintensität um den Wert ΔF ab. Die Abklingkinetik entspricht in erster Näherung einer Exponentialfunktion der Form $F = F_0 \cdot e^{-t/c} + F_0 - \Delta F$. Die durch die phototaktische Bewegung bewirkte Fluoreszenzänderung wird quantitativ durch die relative Amplituden-Änderung $\Delta F/F_0$ sowie die Zeitkonstante c der exponentiellen Abklingkinetik beschrieben.

Patentansprüche

1. Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung des Phytoplanktongehalts natürlicher Wasserproben und zur Unterscheidung verschiedener Algengruppen aufgrund von Chlorophyllfluoreszenzmessungen unter Verwendung von Meßlicht- und Starklichtpulsen unterschiedlicher Intensität, Frequenz, Phase und Wellenlänge gekennzeichnet durch

- a) eine erste Lichtquelle (4) zur Anregung der Fluoreszenz mit einem schwachen Meßlicht in einem definierten Teilvolumen (2) (Meßlichtvolumen) des zu untersuchenden Wassers im Probenraum (1) der Meßeinrichtung;
- b) eine zweite Lichtquelle (5) zur Belichtung des Restvolumens (3) der zu untersuchenden Wasserprobe mit phototaktisch wirksamem Licht;
- c) sprunghafte Veränderung der Lichtintensität in dem Restvolumen (3) der Wasserprobe relativ zum Meßlichtvolumen (2), so daß bei Anwesenheit phototaktisch aktiver Phytoplanktonarten relative Konzentrationsverschiebungen zwischen den beiden Volumina induziert werden;
- d) Messung und digitale Speicherung der auf diese Weise induzierten zeitabhängigen Fluoreszenzänderungen bei Messungen an reinen Kulturen verschiedener, in der Praxis relevanter Phytoplanktonarten;
- e) Computer-gestützte Beschreibung der gemessenen zeitlichen Fluoreszenzänderungen durch Exponentialfunktionen, deren charakteristische Zeitkonstanten und relative Amplituden im Computer gespeichert werden;
- f) Messung der unter denselben experimentellen Bedingungen induzierten zeitabhängigen Fluoreszenzänderungen an einer natürlichen Wasserprobe und Computer-gestützte Beschreibung (Fitting) der gemessenen zeitlichen Fluoreszenzänderungen durch die Summe der für die verschiedenen relevanten Phytoplanktonarten zuvor gespeicherten Exponentialfunktionen, mit Bestimmung der relativen Amplituden, welche die relativen Konzentrationen dieser Phytoplanktonarten in der Wasserprobe ergeben.

2. Meßeinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die zur Fluoreszenzanregung im Meßlichtvolumen (2) und zur phototaktischen Belichtung im Restvolumen (3) der zu untersuchenden Wasserprobe eingerichteten Lichtquellen (4 und 5) aus Gruppen von lichtemittierende Dioden (LED-Arrays) mit unterschiedlichen Emissions-Wellenlängen und Intensitäten bestehen.

3. Meßeinrichtung nach den Ansprüchen 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Lichtquelle (5) zur Belichtung des Restvolumens (3) der Wasserprobe aus einem LED-Array besteht, dessen Emissionsmaximum dem Maximum des phototaktischen Aktionsspektrum der zu erfassenden Algenklasse entspricht.

4. Meßeinrichtung nach den Ansprüchen 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß die Intensität des Meßlichts so niedrig gewählt ist, daß dieses phototaktisch unwirksam ist.

5. Meßeinrichtung nach den Ansprüchen 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß die erste als LED-Array ausgestaltete Lichtquelle (4) nicht nur mit verschiedenfarbigen LEDs für schwache Meßbelichtung, sondern auch mit roten LEDs für eine starke, photosynthetisch wirksame Belichtung bestückt ist.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

